

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22758

研究課題名(和文) 赤痢アメーバの病原性理解・治療標的開発を目指したPI4K複合体の機能解明

研究課題名(英文) Functional analysis of PI4K complex for elucidation of pathogenesis and drug development of *E. histolytica*

研究代表者

渡邊 菜月 (Watanabe, Natsuki)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任研究員

研究者番号：00883323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：Phosphatidyl inositol 4-kinase (PI4K) の補助因子の機能解析のために、補助因子であることが予想された結合分子である赤痢アメーバ(*Eh*)TTC7とEHI\_151680について、これら遺伝子の発現抑制株を作成した。これらの株について、貪食効率が低下しており、PI4Kやその補助因子が貪食に関与していることが明らかとなった。また、HAタグ融合タンパク質発現赤痢アメーバ株を樹立し、局在解析を行った。発現量は少なかったが、細胞質局在が確認された。これはGFP融合タンパク質と同じ局在であり、これら補助因子が細胞質に局在することをサポートする結果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PI4P/PI4KIII は、C型肝炎ウイルス (HCV) や、ポリオウイルスの細胞内での複製時に、重要な役割を担っていることが示されている。さらに、PI4KIII は抗マalaria薬の標的としても注目され、特異的阻害剤が薬剤として開発されている。本研究により、赤痢アメーバにおいてPI4Kが貪食という重要な病原機構に関与することが明らかとなった。これは、貪食機構の解明や薬剤開発のために重要な進展となった。また、多種生物において報告がなかった、PI4Kが貪食に関与するという事実が明らかとなった。これは多種生物におけるPI4K機能解析の際にも、重要な事実となる。

研究成果の概要(英文)：To understand the function of phosphatidyl inositol 4-kinase (PI4K) in *Entamoeba histolytica*, gene silencing (GS) strains of PI4K co-factors, TTC7 and EHI\_151680 which were detected in proteome analysis of PI4K immunoprecipitated samples, were established. Phagocytosis efficiency was decreased in TTC7 and EHI\_151680 gene silencing strain, suggesting PI4K and these co-factors are involved in phagocytosis. This fact is consistent with previous report about PI4P. Furthermore, HA tagged TTC7 and EHI\_151680 overexpressing strains were established, and immunofluorescence assay was done to confirm the localization of co-factors. Expression level was too low, however the localization was confirmed in cytosol. This localization is same as GFP-tagged TTC7 and EHI\_151680 suggesting this result support previous result and the localization is clearly cytosol.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：PI4K TTC7 phosphatidylinositol phagocytosis 貪食 赤痢アメーバ

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 本研究の学術的背景、研究課題の核心をなす学術的「問い」

・**赤痢アメーバとその病原機構理解の現状**：赤痢アメーバはヒトの大腸や肝臓に寄生して腸炎・赤痢・肝膿瘍を起こす原虫である。その罹患数は全世界人口の約1%であり、年間約10万人が死亡する。治療薬は、メトロニダゾールが唯一の薬剤であり、催奇形性・薬剤耐性の出現から新規治療薬の開発、治療標的の発見が求められている。赤痢アメーバでは運動・細胞接着・貪食・加水分解酵素分泌が病原性の中心を担うことが示されている (Labruyere & Guillen, 2006; Ralston *et al.*, Nature, 2014)。また、我々が世界に先駆けて報告してきた PIPs シグナルに関する成果は、PIPs の病原機構における見逃されてきた重要性を示してきた (Nakada-Tsukui *et al.*, 2009)。

・**PIPs**：リン酸化部位の違いにより7つの異性体として存在し、特異的なリン酸化・脱リン酸化酵素により産生される。それぞれ特異的なオルガネラ膜に局在し、結合タンパク質の局在・機能を調節することで、様々な細胞内イベントを時空間的に制御する。

・**PI4P と PI4K の一般的な重要性**：PI4P は  $PI(4,5)P_2$ 、 $PI(3,4,5)P_3$  の前駆体としてのみならず、PI4P 自体が、オルガネラ膜の組成維持やオートファジー等に重要な役割を持つことが明らかとなってきた。また、PI4KIII は複雑な複合体を組むことで活性や局在が制御されていることが知られている。マラリアでは、PI4KIII が薬剤標的として同定され (McNamara *et al.*, 2013)、PI4KIII に対する薬剤の開発が行なわれている。また、C型肝炎ウイルスを始め多くのウイルスでは宿主の PI4P 欠損により複製が阻害され、宿主側の治療標的としても注目されるなど、PI4K の重要性の理解は高まっている。

・**本研究課題の中心的な命題**：赤痢アメーバとヒトの PI4K の根本的相違は何か？病原性における重要性は何か？：赤痢アメーバにおいて PI4P は貪食等の病原機構に間違いなく関与する。しかし、PI4P 産生の時空間的詳細、PI4K 複合体構成因子・制御機構の詳細については全く不明であり、その解明とヒト宿主との比較による特異点の理解が本研究の核心である。

## 2. 研究の目的

- ・**赤痢アメーバの PI4K 複合体の全構成因子、各因子の役割の解明**。具体的には、TTC7、赤痢アメーバ特異的補助因子 EHI\_151680、未同定因子による PI4K 活性・局在の調節分子機構を生化学的・遺伝学的・構造化学的に解明する。
- ・**PI4K の阻害リードの探索・発見**。構造既知化合物ライブラリーから特異的な活性阻害物質を探索する。遺伝子発現抑制による遺伝学的証明を化学的証明により裏付ける。

## 3. 研究の方法

### [免疫沈降法による PI4K 複合体の全因子の特定]

赤痢アメーバにおいて、PI4K (HA 標識)、TTC7 (myc 標識)、EHI\_151680 (GFP 標識) の、3 遺伝子同時発現株を樹立する。株の樹立後、相互アフィニティ免疫沈降法、質量分析によるタンパク質同定により複合体の全因子を特定し、生化学的に PI4K 複合体の全容の解明を行う。

### [補助因子の遺伝子抑制株の樹立と PI4K の局在変化の観察による各因子の機能の特定]

補助因子 (TTC7, EHI\_151680 並びに新規発見因子) の遺伝子発現抑制株を樹立する。補助因子遺伝子発現抑制状態で HA-PI4K を発現させ、免疫蛍光染色により HA-PI4K の局在、並びに活性を観察・測定し、遺伝学的に補助因子による PI4K 局在・活性制御の解明を行う。哺乳細胞では TTC7, Efr3 の共発現が PI4KIII の細胞膜局在に必須である (Nakatsu *et al.*, 2012)。

### [細胞内における PI4K 活性、PI4P 濃度の測定による複合体因子の機能解析]

標識 (GFP など) を付加した PI4P 認識ドメイン (PH, sidM) 融合タンパク質を各補助因

子遺伝子の発現抑制株に発現させ、PI4P の量・局在への影響を観察・測定し、細胞計測化学的に各因子の PI4P 合成・局在への役割を解明する。

#### [PI4K 活性測定を用いた、複合体補助因子による PI4K 活性制御の解明]

赤痢アメーバ PI4K を TTC7、EHI\_151680 と共に pColdI ベクターを用いて組換えタンパク質として発現させ、活性や基質特異性を測定し、各補助因子の PI4K 活性への影響を評価する。通常、PI4KIII は PI のみを基質とするが、赤痢アメーバは PI4K を 1 種類しか持たない為、基質に多様性がある可能性がある。ヒトでは TTC7、FAM126 が PI4KIII を活性化することが知られる (Baskin *et al.*, 2015)。

#### [PI4K 活性阻害剤の探索]

ATP の加水分解による ADP の産生を高感度に蛍光検出する 1536 穴プレートを用いたハイスループットスクリーニング系を用いて、創薬機構 (DDI) のもつコアライブラリー (1 万化合物) から阻害剤探索を行う。2  $\mu$ M で 90% 阻害を選択の基準とする。最も高い阻害を示す 20 化合物に関して、インビトロで細胞の接着・貪食などに対する影響を確認する。

## 4 . 研究成果

Phosphatidyl inositol 4-kinase (PI4K) の補助因子の機能解析のために、補助因子であることが予想された結合分子である赤痢アメーバ(Eh)TTC7 と EHI\_151680 について GFP タグ融合タンパク質発現赤痢アメーバ株を樹立し、免疫蛍光染色により局在解析を行った。その結果、局在は細胞質であり、PI4K や PI4P とは異なる局在であった。また、HA タグ融合タンパク質発現赤痢アメーバ株を樹立し、局在解析を行った。発現量は少なかったが、細胞質局在が確認された。これは GFP 融合タンパク質と同じ局在であり、これら補助因子が細胞質に局在することをサポートする結果となった。

さらに、EhTTC7、EHI\_151680 の遺伝子発現抑制株を樹立した。これらの株について、運動能力の低下が見られないことが確認された。これらの株について、貪食効率が低下しており、PI4K やその補助因子が貪食に関与していることが明らかとなった。

標識 (GFP など) を付加した PI4P 認識ドメイン (PH, sidM) 融合タンパク質を各補助因子遺伝子の発現抑制株に発現させ、PI4P の量・局在への影響を観察・測定し、細胞計測化学的に各因子の PI4P 合成・局在への役割を解明したい。そのために、遺伝子発現抑制と過剰発現を同時に行える機構を確立した。Vps35 遺伝子発現抑制株において、CP5-HA 過剰発現を行い、その遺伝子発現抑制と過剰発現を確認した。

また、PI4K の活性を測定するために、PI4K のリコンビナントタンパク質の発現実験を行っているが、全長が 5 kbp と長いため、発現がうまくいかず、さらなる条件検討等が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Watanabe Natsuki、Nakada-Tsukui Kumiko、Maehama Tomohiko、Nozaki Tomoyoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Dynamism of PI4-Phosphate during Interactions with Human Erythrocytes in Entamoeba histolytica	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1050 ~ 1050
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms8071050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Natsuki、Nakada-Tsukui Kumiko、Nozaki Tomoyoshi	4. 巻 83
2. 論文標題 Diversity of phosphoinositide binding proteins in Entamoeba histolytica	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102367 ~ 102367
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parint.2021.102367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Das Koushik、Watanabe Natsuki、Nozaki Tomoyoshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Two StAR-related lipid transfer proteins play specific roles in endocytosis, exocytosis, and motility in the parasitic protist Entamoeba histolytica	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 9551 ~ 9551
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.ppat.1009551	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 渡邊菜月
2. 発表標題 赤痢アメーバにおいて多様化したレトロマー複合体の機能解析
3. 学会等名 共生生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊菜月
2. 発表標題 レトロマー複合体を基軸とした赤痢アメーバの病原因子輸送機構の解明
3. 学会等名 寄生虫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Natsuki Watanabe
2. 発表標題 Diversification and Isotype-specific Functions of Vps26 and Vps35 of the Retromer Complex in the Parasitic Protozoan <i>Entamoeba histolytica</i>
3. 学会等名 American Society of Cell Biology (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関